

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

PATENT

1c978 U.S. PTO
10/003120
12/06/01

In re application of: **Makoto HAZAMA**

Serial No.: Not Yet Assigned

Filed: **December 6, 2001**

For: **METHOD OF DETERMINING A BASE SEQUENCE FOR NUCLEIC ACID**

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

December 6, 2001

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application is hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

Japanese Appln. No. 2001-000499, filed January 5, 2001

In support of this claim, the requisite certified copy of said original foreign application is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicant has complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copy.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 01-2340.

Respectfully submitted,
**ARMSTRONG, WESTERMAN, HATTORI
McLELAND & NAUGHTON, LLP**



Donald W. Hanson
Reg. No. 27,133

Atty. Docket No.: 011532
Suite 1000, 1725 K Street, N.W.
Washington, D.C. 20006
Tel: (202) 659-2930
Fax: (202) 887-0357
DWH/yap

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

Jc978 U.S. PTO
10/003120
12/05/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2001年 1月 5日

出 願 番 号
Application Number:

特願2001-000499

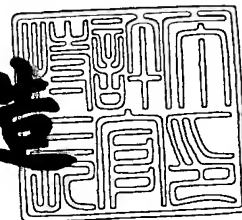
出 願 人
Applicant(s):

株式会社島津製作所

2001年 8月31日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3079321

【書類名】 特許願

【整理番号】 K1000648

【提出日】 平成13年 1月 5日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 21/64

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津
 製作所内

 【氏名】 狭間 一

【特許出願人】

 【識別番号】 000001993

 【氏名又は名称】 株式会社島津製作所

【代理人】

 【識別番号】 100085464

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 野口 繁雄

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 037017

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 9110906

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸の塩基配列決定方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸断片試料を電気泳動し、その検出データに基づいて核酸の塩基配列を決定する方法において、

(A) 前記検出データの先頭から一定数Nポイントのデータについて予め定めたピーク間隔をパラメータにしてフーリエ変換による波形整形処理を施すステップ、

(B) そのNポイントのデータの先頭からPポイント ($P < N$) のデータについて塩基配列を決定するステップ、

(C) 塩基配列決定結果からピーク間隔を求めるステップ、

(D) 直前に塩基配列決定を行なったデータの最後からLポイント ($L < M$) 戻った位置からNポイントのデータについて、直前に求めたピーク間隔をパラメータにしてフーリエ変換による波形整形処理を施すステップ、及び

(E) 2回目以降の波形整形を行なったNポイントのデータのうち、その中央部のMポイント ($M < N$) のデータについて塩基配列を決定するステップ、を備え、

データがなくなるまで又はデータはあるが解析の必要がなくなるまでステップ

(E) → (C) → (D) を繰り返すことを特徴とする核酸の塩基配列決定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はDNA（デオキシリボ核酸）などの核酸の塩基配列を決定する方法に関し、特に電気泳動により得られたデータから塩基配列を決定する前にノイズを除去するために施す前処理方法に特徴をもつ塩基配列決定方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

核酸断片試料を電気泳動し、その検出データに基づいて核酸の塩基配列を決定

する方法では、電気泳動により得られる検出データは核酸断片試料に該当するピーク信号であるが、そのピーク信号はノイズ成分を含んでいるため、前処理により波形整形を施した後に、ピーク信号に基づいて塩基配列を決定する。

【0003】

前処理は電気泳動で得られた全ての検出データに対して一括して行ない、その後その処理波形を用いて塩基配列決定（ベースコール）を行なうのが一般的である。

【0004】

波形整形のための前処理方法の1つとして、FFT（高速フーリエ変換）に代表されるフーリエ変換による波形整形処理がある。この前処理では、電気泳動により検出されたピーク信号のデータをフーリエ変換する際、フィルタリング処理を施し、その後、逆フーリエ変換によりピーク信号に戻す。そのフィルタリング処理で用いるフィルタ関数は、主に高周波成分であるノイズを取り除くために、DNAピーク出現間隔より短い周波数の信号を取り除くためのものである。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

①FFT処理は 2^n のデータ数に対して行なわねばならないが、データ数は泳動時間やサンプリング周波数によって変化し、一定でない。

②ノイズ除去のためのフィルタ関数は主に高周波成分であるノイズ、具体的にはDNAピーク出現間隔より短い周波数の信号を取り除くために設定される。したがって、泳動速度がフィルタ関数の重要なパラメータになるのだが、泳動速度は泳動中徐々に変化しているので、データ全域にわたって同じパラメータでノイズフィルタリングをすることはできない。

【0006】

そこで、本発明は泳動速度が変化している長いデータ区間に対してもフーリエ変換に基づいてノイズを除去し、精度よく塩基配列を決定できるようにすることを目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明の塩基配列決定方法を、図1を参照して説明する。

本発明は、核酸断片試料を電気泳動し、その検出データに基づいて核酸の塩基配列を決定する方法であって、(A) その検出データの先頭から一定数 N ポイントのデータについて予め定めたピーク間隔をパラメータにしてフーリエ変換による波形整形処理を施すステップ(S1, S2)、(B) その N ポイントのデータの先頭から P ポイント($P < N$)のデータについて塩基配列を決定するステップ(S3)、(C) 塩基配列決定結果からピーク間隔を求めるステップ(S4)、(D) 直前に塩基配列決定を行なったデータの最後から L ポイント($L < M$)戻った位置から N ポイントのデータについて、直前に求めたピーク間隔をパラメータにしてフーリエ変換による波形整形処理を施すステップ(S5, S6)、及び(E) 2回目以降の波形整形を行なった N ポイントのデータのうち、その中央部の M ポイント($M < N$)のデータについて塩基配列を決定するステップ(S7)を備え、データがなくなるまで又は信号の減衰やデータ異常などによりデータはあるが解析の必要がなくなるまでステップ(E) → (C) → (D)を繰り返す。

【0008】

ここで、ポイントとは、電気泳動の検出位置において、一定時間ごとに走査をして取り込んだデータを表わしており、ポイント数は泳動時間に対応している。

【0009】

N ポイント幅のフーリエ変換処理と、それに内包される P ポイント幅又は M ポイント幅の塩基配列決定処理は、ピーク間隔(泳動速度)をパラメータとする完全に独立したプロセスなので、総データ数には何ら依存しない。

N ポイント幅のフーリエ変換処理を行なう直前のピーク間隔(泳動速度)を利用するので、フィルタ関数と塩基配列決定処理に最も適切なパラメータを与えることができ、結果として塩基配列決定の精度が増す。

【0010】

【発明の実施の形態】

フーリエ変換による波形整形処理としてFFT処理を適用する。その場合、FFT処理の幅(データ数)を 2^n ポイントと固定し、処理後その中心の $2^{(n-1)}$ ポイントに対して塩基配列決定を行ない、その塩基配列決定結果からピーク間隔(

泳動速度)を得、後半の $2^{(n-1)}$ ポイントの位置から再びFFT処理を 2^n ポイントの幅で行なう。この繰り返しをデータの最後まで行なう。

【0011】

【実施例】

図2と図3により一実施例を説明する。

実施例では、 $N = 2^{(n=8)} = 256$ ポイントでFFT処理を行なっている。

①ピーク間隔の初期値を求める。

②先頭から256ポイントについてFFT処理を行なう。FFT処理は、フーリエ変換→①をパラメータにフィルタリング処理→逆フーリエ変換の手順で行なう。

【0012】

③先頭から $M = 192$ ポイントについて、①をパラメータに塩基配列決定処理を行なう。

④塩基配列決定結果からピーク間隔を求める。

【0013】

⑤塩基配列決定処理を行なった幅の後ろから $L = 64$ ポイント戻った位置から256ポイントについてFFT処理を行なう。この時点で256ポイントなければ終了する。ここでのFFT処理は、フーリエ変換→④をパラメータにフィルタリング処理→逆フーリエ変換の手順で行なう。

⑥64ポイント目を先頭に128ポイントについて、④をパラメータに塩基配列決定処理を行なう。

⑦④へ戻る。

【0014】

実施例ではFFT処理を行なっているため、フーリエ変換の幅(データ数)を 2^n ポイントと固定しているが、FFT処理でなければフーリエ変換の幅 N 、塩基配列を決定する幅 P 、 M 、及びフーリエ変換を行なうために戻る幅 L は、 2^x の数に限らず、 $N > M > L$ 、 $N > P > L$ の関係を満たす整数であればよい。

【0015】

【発明の効果】

本発明では、検出データの一定ポイントのデータについてその直前に求めたピーク間隔をパラメータにしてフーリエ変換による波形整形処理を施し、その波形整形されたデータに基づいて塩基配列を決定するとともに、波形整形処理を施す範囲を一部重複させながら進めるようにした。通常、塩基配列決定では、塩基配列決定後の解析（整形）波形も必要となる。本発明の場合、基本的には不連続になることが想定されるが、一部のポイントが常に重複しながらフーリエ変換処理されているので、塩基配列決定部分をつなぎ合わせて行くだけで解析波形が容易に得られる。

【 0 0 1 6 】

また、データ全体を一括してフーリエ変換処理すると、気泡やゴミ等の影響で出現した不連続部位のデータが、正常な部位のデータに悪影響を与えてしまう場合があるが、本発明では不連続部位に到達するまでは何ら影響は受けない。

さらに、フーリエ変換処理と塩基配列決定処理の幅を固定し、かつ独立性を高めているので、新たなルールや処理を付加する場合に、融通性が高い。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明を説明するフローチャート図である。

【図 2】

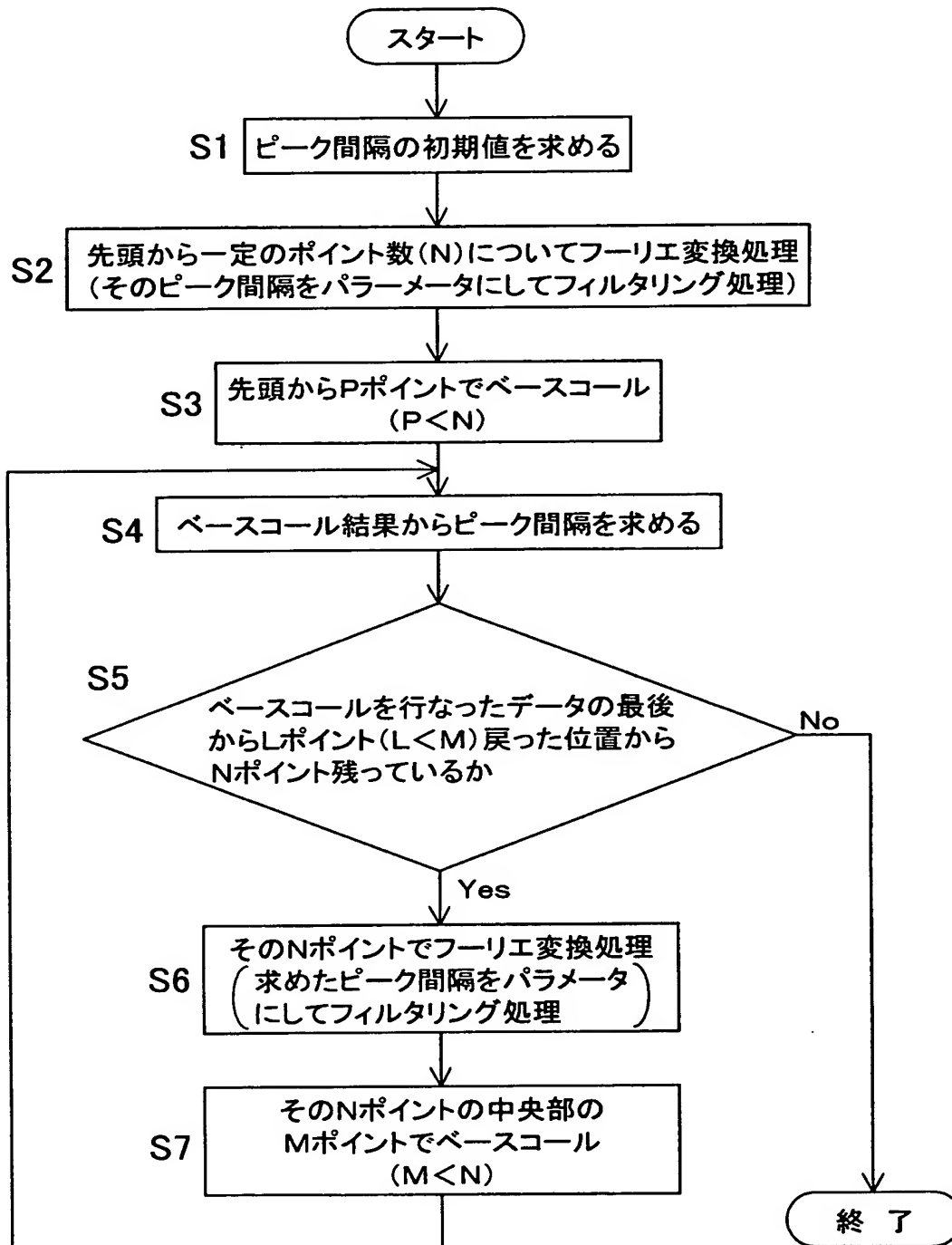
一実施例の処理を模式的に示す図である。

【図 3】

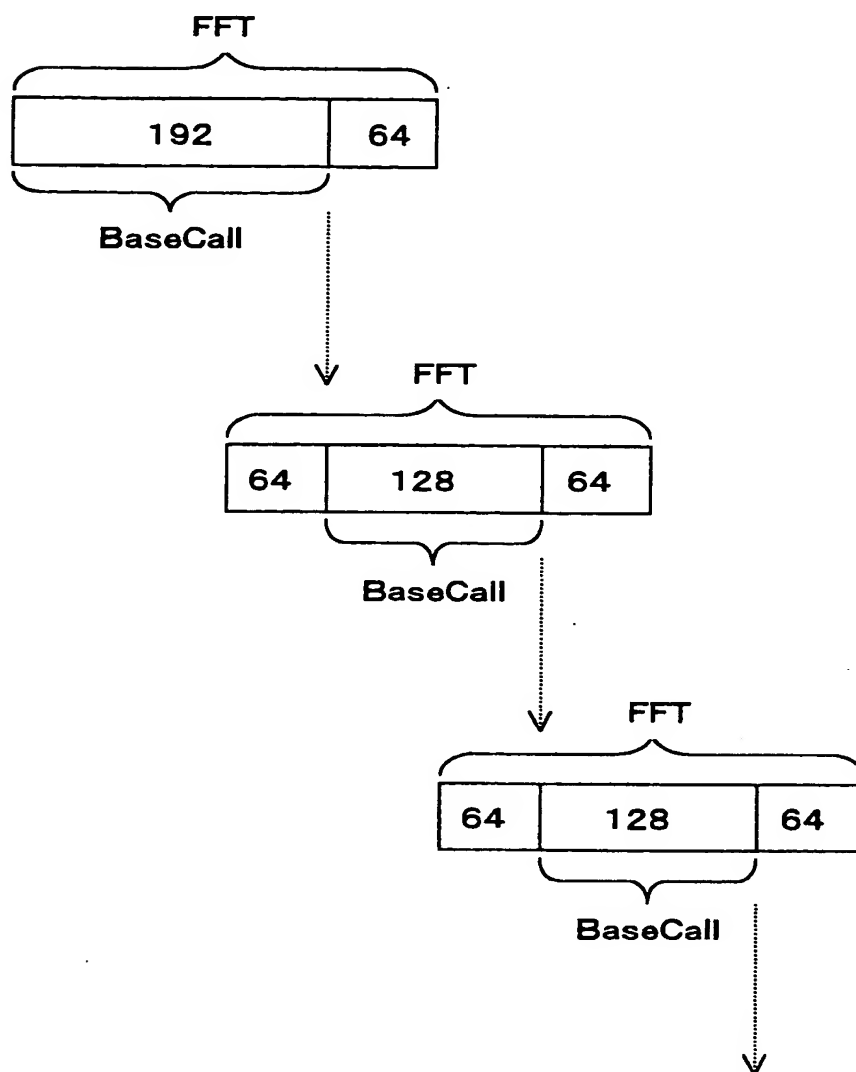
同実施例における処理を電気泳動結果の波形図とともに示す図である。

【書類名】 図面

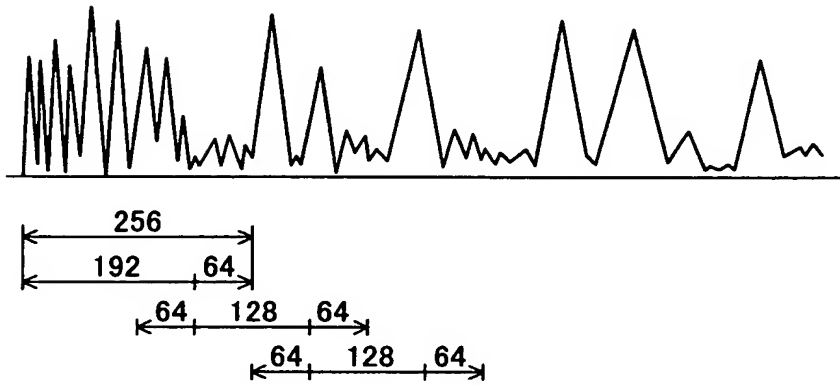
【図 1】



【図 2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 泳動速度が変化している長いデータ区間に対してもフーリエ変換に基づいてノイズを除去し、精度よく塩基配列を決定できるようにする。

【解決手段】 検出データの先頭からNポイントのデータについて予め定めたピーク間隔をパラメータにしてフーリエ変換による波形整形処理を施し（S1, S2）、そのNポイントのデータの先頭からMポイント（ $M < N$ ）のデータについて塩基配列を決定し（S3）、塩基配列決定結果からピーク間隔を求める（S4）。塩基配列決定を行なったMポイントのデータの最後からLポイント（ $L < M$ ）戻った位置からNポイントのデータについて、直前に求めたピーク間隔をパラメータにしてフーリエ変換による波形整形処理を施し、その後同様に塩基配列決定、ピーク間隔算出及び波形整形処理を繰り返す。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号 [000001993]

1. 変更年月日 1990年 8月27日
[変更理由] 新規登録
住 所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
氏 名 株式会社島津製作所